

HPLC METHOD FOR PURIFYING ORGANIC COMPOUND

Patent number: JP2001124755
Publication date: 2001-05-11
Inventor: JARE AZUMI ABEDEI
Applicant: AVENTIS CROPS SCIENCE SA
Classification:
- international: G01N30/82; B01D15/08; C07B63/00; G01N30/04;
G01N37/00
- european: B01D15/08; G01N30/82; G01N30/90
Application number: JP20000240738 20000809
Priority number(s): US19990148153P 19990810

Also published as:

EP1162456 (A1)

CA2315542 (A1)

Report a data error here**Abstract of JP2001124755**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a rapid and appropriate method by HPLC for purifying compounds from a compound library, e.g. a combinatorial library or the like. **SOLUTION:** The method is applied to purify the whole of the compound library without changing correlated purification parameters of HPLC for separation with the use of an appropriate representative sample of the compound library based on an elution state at a predetermined analysis HPLC column or on a migration state at a predetermined TLC.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-124755

(P2001-124755A)

(43) 公開日 平成13年5月11日 (2001.5.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 30/82		G 0 1 N 30/82	
B 0 1 D 15/08		B 0 1 D 15/08	
C 0 7 B 63/00	Z C C	C 0 7 B 63/00	Z C C F
G 0 1 N 30/04		G 0 1 N 30/04	P
30/90		30/90	

審査請求 未請求 請求項の数13 O L 外国語出願 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-240738(P2000-240738)

(22) 出願日 平成12年8月9日 (2000.8.9)

(31) 優先権主張番号 1 4 8 1 5 3

(32) 優先日 平成11年8月10日 (1999.8.10)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 500361434

アベンティス・クロップサイエンス・エ
ス・アー

フランス国、エフ-69009・リヨン、アブ
ニユ・ルネ・カサン、55

(72) 発明者 ジヤレ・アズミ・アベディー

アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・
26713、ローリイ、サニーストーン・ウエ
イ・2601

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄 (外3名)

(54) 【発明の名称】 有機化合物を精製するためのHPLC法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】化合物のライブラリ、例えばコンビナトリアル
ライブラリなどからの化合物群の迅速で適切なHPLC
による精製法を提供する。

【解決手段】化合物のライブラリの適切な代表試料を用
いて、所定の分析用HPLCカラムでの溶出状態及び又
は所定のTLCでの移動状態から、相互に関係する分離
用HPLCの精製パラメータを変更することなく、化合
物ライブラリ全体の精製に適用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1種類以上の有機化合物を精製及び／又は特徴付けるための方法であって、

a) 精製しようとする化合物のライブラリを選択する工程、

b) 該ライブラリの代表試料に対してTLC及び／又は分析用HPLCを行う工程であって、該試料は該ライブラリの10パーセント未満を構成する工程、

c) 該代表試料が分析用HPLCカラムからどのように溶出するか、及び／又は該試料がTLCプレート上をどのように移動するかに応じて、相互に関連付けられた分離用HPLC法を決定する工程、及び

d) 該ライブラリの全て又は実質的に全てを精製する工程、を包含し、

該相互に関連付けられた分離用HPLC法は、分析用HPLCが行われる場合には保持時間の3つ以上の帯域の間の相関、及び／又はTLCが行われる場合には保持因子の3つ以上の帯域の間の相関に基づいて、代表試料中の実質的に全ての化合物が特定の帯域に入るのであれば、特定の相互に関連付けられた分離用HPLCプロトコルを該帯域内に入る化合物の精製に用いることができるように決定される方法。

【請求項2】 分析用HPLC及びTLCの両者を工程aにおいて行う請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ライブラリの全て又は実質的に全てを精製する前に代表試料を分離用HPLCによって精製する請求項1に記載の方法。

【請求項4】 代表試料を精製した後に該試料中の化合物の純度を決定する請求項3に記載の方法。

【請求項5】 純度を決定した後、工程aにおいて行ったTLCと同じであるか又は実質的に同じ条件下で、ライブラリの10ないし100パーセントに対してTLCを行う請求項4に記載の方法。

【請求項6】 代表試料のTLCとライブラリの10ないし100パーセントのTLCとを比較する請求項5に記載の方法。

【請求項7】 ライブラリの50ないし100パーセントをTLCによって分析する請求項5に記載の方法。

【請求項8】 代表試料及びライブラリの10ないし100パーセントのTLCが同じ帯域への化合物の移動を示す場合、ライブラリ全体を分離用HPLCで精製する請求項6に記載の方法。

【請求項9】 代表試料及びライブラリの10ないし100パーセントのTLCが同じ帯域への化合物の移動がないことを示す場合、ライブラリ全体を代替法を用いて分離用HPLCによって精製する請求項6に記載の方法。

【請求項10】 代表試料がライブラリ全体の2ないし5パーセントである請求項1に記載の方法。

【請求項11】 ライブラリの全て又は実質的に全ての

分離用HPLCの間、分離用HPLCカラムから溶出する試料中の対象の化合物の存在をUV及び／又はMS検出を用いて決定することによって画分の収集を開始する請求項1に記載の方法。

【請求項12】 分離用HPLCによって精製される化合物の全て又は実質的に全ての純度が90パーセントを上回る請求項1に記載の方法。

【請求項13】 分析用HPLCを行うのであれば、分離用HPLCを行う前に代表試料に対してのみ行う請求項12方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】（発明の分野）本発明は、一般には、化合物のライブラリ、例えば、コンビナトリアルライブラリ及びリード生成ライブラリの精製及び／又は特徴付けに関する。

【0002】（発明の背景）現在、合成化合物を精製するための一般法が数多く存在する。これらの方法は、一般には、単一の標的化合物を複数の不純物から精製することを含む。

【0003】化合物は、現在、比較的に数多くコンビナトリアルライブラリ及びリード生成ライブラリとして調製されている。しばしば、化合物は、マルチウェルプレート又はマルチチューブアレイにおいて、数千に達する多くの関連化合物として合成される。化合物のライブラリをそれらの合成に合わせて精製し、かつ特徴付けることは困難である。

【0004】多数の化合物を精製するための方法の1つは個々の化合物をクロマトグラフィー処理する反復法を含む。これは、各々の分子の合成、後処理、及び精製の完全なサイクルを構成する。しばしば、精製しようとする化合物の適切な精製法を開発するのに多大な時間が費やされる。

【0005】様々な有機化合物に適用可能な、化合物のライブラリを精製及び／又は特徴付けるための効率的な方法を開発することは有利である。本発明はそのような方法を提供する。

【0006】（発明の要約）化合物、例えば、コンビナトリアルライブラリ又はリード生成ライブラリのような化合物のライブラリを精製及び／又は特徴付けるための方法が開示される。この方法において用いることができる精製装置も開示される。

【0007】この方法は、構造的に類似する化合物、例えば、コンビナトリアルライブラリ及びリード生成ライブラリにおけるものが、しばしば、大まかには類似する薄層クロマトグラフィー（TLC）プレート上での保持因子（R_f）及び高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）カラムでの保持時間を有するという発見を前提にする。この方法は、この発見を、類似化合物のライブラリを精製するのに最適な条件の決定に用いる。

【0008】所定のカラム充填、溶媒系、及び流速に対

して、ほとんどの化合物は特定の程度まで分析用及び／又は分離用HPLCカラムから溶出する傾向にある。同様に、ほとんどの化合物は特定の程度までTLCプレート上を移動する。幾つかの化合物は全く移動しない($R_f = 0$)のに対し、他のものは低 R_f (例えば、 $0.05 < R_f < 0.2$)、中 R_f (例えば、 $0.2 < R_f < 0.8$)、又は高 R_f (例えば、 $R_f > 0.8$)で移動する。ライブラリ中の大部分の化合物が溶出し(分析用HPLCの場合)、又は移動する(TLCの場合)、一連の3つ以上、好ましくは4つ以上の R_f の帯域、又は、分析用HPLCの場合には、一連の保持時間の帯域、例えば、TLCプレート上の低、中及び高 R_f を容易に決定することができる。これらの帯域は、分離又は半分離用HPLCを実施するための分離又は半分離方法と関連し得る。

【0009】所定の分析用HPLC及び／又はTLCプロトコルに対して、1つの帯域中の化合物を他の帯域中の化合物から分離することができる一組の分離用HPLC条件を同定することができる。したがって、化合物ライブラリの代表試料中の化合物の全て、又は実質的に全てが同じ帯域に存在するのであれば、そのライブラリを、TLC及び／又は分析用HPLCの帯域に容易に相互関連付けすることができる同じHPLCプロトコルを用いて精製することができる。

【0010】ここに記載される方法は、化合物のライブラリ、例えば、コンビナトリアルライブラリ又はリード生成ライブラリからの化合物の代表試料をTLC及び／又は分析用HPLCによって評価し、TLCプレート上でそれらが移動し、及び／又は分析用HPLCカラムから流出する帯域を決定することを含む。ひとたびそれらの帯域が同定されたら、関連する分離又は半分離方法を用いてそのライブラリを精製する。

【0011】化合物のライブラリを精製するための適切な条件は、そのライブラリの代表試料を所定の分析用HPLCカラム、溶媒系及び流速、及び／又は所定のTLC裏層及び溶媒系について経路探索することによって実現することができる。関連する分離又は半分離HPLC法はそれらの精製パラメータを変更することなく化合物ライブラリの精製に適用することができ、そのため単一の方法をそのライブラリ全体に適用することができる。

【0012】適切な試料サイズは、典型的にはライブラリ中の化合物の多様性に依り、そのライブラリの2ないし5%のオーダーである。適切な精製経路を探索することから、このアプローチをここでは「経路探索 (route scouting)」と呼ぶ。

【0013】好ましくは、TLC及びHPLCの両者を化合物の代表試料に対して実施する。ライブラリ全体を精製する前にそのライブラリからの化合物の試料に対して分離用又は半分離用HPLCを実施することも好ましい。これによって、例えば、代表試料中の化合物の純度

を決定することにより、それらの条件がそのライブラリ全体を精製するの適切であることを確認することができる。また、ライブラリの10ないし100%、好ましくは50ないし100%に対してTLCを行い、そのTLCを代表試料におけるものと比較することもできる。ライブラリ全体に対してTLCを行い、及び／又は化合物の代表試料の純度を決定することにより、そのライブラリの大部分が適度に精製され得ることを確実にすることができる。純度が代表試料に関して適切なものではない場合、又はそのライブラリのTLCが代表試料のものと十分に一致しない場合、代わりの分離用HPLC条件を用いることができる。

【0014】可能であるならば、その方法がライブラリ全体に適用可能であることを確実にものとする助けとなるように、代表試料はそのライブラリにおいて合成された最大極性及び最小極性化合物を含むべきである。

【0015】ここに記載される方法は、化合物のライブラリの精製及び特徴付けの時間を実質的に節約することになり、かつ純度が90%を上回る化合物を提供することが可能である。

【0016】(詳細な説明) 化合物はしばしばコンビナトリアルライブラリの形態で合成され、これらはしばしばマルチウェルプレート又はマルチチューブアレイの形態にある。これらの化合物の合成、精製及び評価における主な妨げはそれらの化合物に適切な精製条件の決定である。ここに記載される方法では、構造的に関連する化合物のライブラリ全体をいかにして精製することができるかが詳述される。

【0017】これらの方法は、構造的に類似する化合物、例えば、コンビナトリアルライブラリ及びリード生成ライブラリにおけるものが、しばしば、大まかには類似する薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート及び高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) カラムでの保持時間を有するという発見を前提にする。所定の吸着剤、溶媒系、及び流速に対して、ほとんどの化合物はプレート上で特定の程度移動する傾向にある。例えば、幾つかの化合物はほとんど移動することがない(ほぼ0の R_f)。他のものは低 R_f (例えば、 0.05 ないし 0.2)、中 R_f (例えば、 0.2 ないし 0.8)、又は高 R_f (0.8 超)で移動する。これらの方法は、この発見を、類似する化合物のライブラリを精製するのに最適な条件の決定に用いる。

【0018】これらの方法の利点は、分析用HPLCを行うのであれば、分離用HPLCを行う前に代表試料に対してのみ行うことである。ここに記載される方法を用いて、分離用HPLCによって精製される化合物の全て又は実質的に全ての純度を90パーセントを上回るものにすることができる。

【0019】(定義) ここで用いられる場合、「分離用HPLC」という用語及び同様の用語は、高(500以

上) マイクログラム、ミリグラム、又はグラムのサイズの生成物画分を生成することが可能であるHPLCシステムを意味する。「分離用」という用語には分離用及び半分離用の両者が含まれるが、ナノグラムから低マイクログラムの範囲の画分をもたらし分析用カラムを含むことは意図されていない。

【0020】ここで用いられる場合、「機械的に動作可能」という用語は、開閉弁を指す場合、その異なる位置が手動動作以外によって、すなわち、コンピュータ選択によって選択される弁を意味する。実際の機械的動作は電氣的（すなわち、ソレノイド制御弁）、気圧式（すなわち、空気圧制御弁）、水力式（液圧制御弁）、又は他のあらゆる等価手段であり得る。

【0021】ここで用いられる場合、「HPLC適合性検出器」は、化合物ピークが溶出する際に検出可能な信号をもたらしことが可能である、HPLCシステムにおいて用いるのに適する検出器である。例えば、化合物が溶出するときにその化合物から信号を生成することが可能である検出器がHPLC適合性検出器である。成分の吸光度が大きく変化する場合、2つ以上の検出器を用いることが必要となることがある。所望の成分を検出することが可能である検出器は、それが非所望ピークを検出できないことで「不適合」検出器であるということはない。

【0022】「廃棄物リザーバ」は、対象の化合物を含まない溶出液、例えば、処理の間にカラムを再生するのに用いられる溶媒又は対象の化合物の溶出の前後にカラムから追い出される溶出液を収集するのに適する終着点である。適切な廃棄物リザーバにはフラスコ、ボトル、又はジャーが含まれる。

【0023】HPLC装置置換クロマトグラフィー（その例がHPLCである）は、試料中においては固定相（SP）と移動相（MP）とのバランスがSPの方向にシフトするという原理に基づく。試料の1つの成分が列車のように互いに置き換わり、SPに対するより大きい親和性を有する置換剤が画分によってこの列車をカラムの外に押し出す。ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー及びHPLCクロマトグラフィーが置換クロマトグラフィーの最も公知の例の幾つかである。

【0024】HPLC装置は、典型的には、少なくとも以下の構成要素を含む：適切な固定相、移動相が充填されたカラム、圧力下で移動相を強制的にカラムに通すためのポンプ、及びカラムから溶出する化合物の存在を検出するための検出器。これらの装置は、ここに記載される方法を用いてでは必要なものではないが、任意に、勾配溶出に備えた手段を含むことができる。

【0025】HPLC分離を実施するための処理時間法及び装置は当該技術分野において公知であり、例えば、以下の参考文献に記載されている：J. Chromatography, 192:222-227 (198

0)、J. Liquid Chromatography 4:661-680 (1981) 及びJ. Chromatography, 249:193-198 (1982)。

【0026】適切な固定相は対象の化合物が溶出するものである。好ましいカラムは逆相カラムであり、これらは天然（異なる長さのアルキル鎖を有するシリカゲル）又は合成架橋ポリマー（スチレン及びジビニルベンゼンからなる）であり得る。固定相の粒径は数 μm から数100 μm の範囲内である。最も好ましい固定相はC₁₈カラムである。

【0027】適切な検出装置には質量分光計及びUV検出器が含まれる。ここに記載される方法では、試料を検出すべき時期を決定するのにこれらの検出器の両者が用いられる。

【0028】ここに記載される方法は、ポンプヘッド、カラムサイズ、移動相及び吸着剤の粒径に応じて、しばしば比較的高い圧力（例えば、約2000psiまで）の使用を必要とする。これらの圧力は、標準的な分離用HPLCの通常の動作条件を超えるものであってもよい。また、これらの方法は、しばしば、標準的な分離用HPLCの通常の動作条件で用いられるものをを超える移動相の流速（例えば、30mL/分超）の使用も必要とする。

【0029】幾つかの態様においては、メタノール/水が移動相として用いられる。メタノール/水溶媒系は、アセトニトリル/水を用いる他の点では等価の系（これはより一般的に用いられるが、より経費がかかるものであり得る）よりも粘性である。粘度の増加は高い背圧を生じる傾向にあり、高圧配管に加えて通常の内径よりも大きい配管の使用を必要とする可能性がある。さらに、比較的小さい粒径（例えば、5ミクロン以下）でのカラム充填（吸着剤）の使用は背圧を生じ、それによってより広い配管の使用がさらに指示される可能性がある。

【0030】精製方法

この方法は、構造的に類似する化合物のライブラリからの化合物の代表試料をTLC及び/又は分析用HPLCによって評価し、どの帯域にそれらがTLCプレート上で移動し、及び/又は分析用HPLCカラムから流出するのかを決定することを含む。ひとたびその帯域が同定されると、相関する分離又は半分離法を用いてそのライブラリを精製する。

【0031】TLCプレート上での保持因子及び/又は分析用HPLCトレースでの保持時間の一連の3つ以上の帯域を決定し、分離用HPLCプロトコルとそれらの帯域の各々を相互に関連付けることができる。これらの帯域は、例えば、TLCプレート上での低、中、及び高R_fであり得、ここで、低、中及び高は恣意的な用語であって、1つの帯域中の化合物を他の帯域中の化合物から分離する相互に関連付けられた分離用又は半分離用

HPLCプロトコルに相当するよう、あらゆる適切な様式で定義することができる。所与の分析用HPLCおよび/またはTLCプロトコルについて、HPLC条件のセットが同定でき、ここで、一つの帯域の化合物を他の化合物のから分離する。

【0032】したがって、化合物のライブラリ中の全ての、又は実質的に全て（すなわち、95%を超える）の化合物が同じ帯域中に存在することをTLC又は分析用HPLCが示す場合、それらは全て1つの相互関連付けられたHPLCプロトコルを用いて精製することができる。

【0033】ここで用いられる場合、代表試料は、典型的にはライブラリの10パーセント未満、より好ましくはライブラリの5パーセント未満、最も好ましくはライブラリの2ないし5パーセントである。試料中の化合物の数は（極性の、したがって、HPLCカラムでの保持時間又はTLCプレートでの保持因子の点での）ライブラリの多様性に依存する。代表的な化合物は、可能であるならば、その方法がライブラリ中の全ての化合物に適用可能であることを確実にする助けとなるように、そのライブラリにおいて合成された最高極性及び最低極性の化合物を含むべきである。

【0034】ここで用いられる場合、帯域は保持時間又は保持因子の範囲を指す。例えば、幾つかの化合物はほとんど移動することがない（ほぼ0のRf）。他のものは低Rf（例えば、0.05ないし0.2）、中Rf（例えば、0.2ないし0.8）、又は高Rf（0.8超）で移動する。TLCを用いて、及びこれらの保持因子範囲を用いて、低、中及び高の3つの帯域を同定することができる。これらの帯域は、TLCプレート上を特定のRfで特定の帯域内に移動する化合物を精製する分離用又は半分離用HPLC条件に相互に関連付けることができる。一連の化合物をこれらの代表的な帯域を用いてTLC及び分離用HPLCにかけたが、それらの結果は実施例1に記載する。TLCプレート上で化合物を溶出するのに好ましい溶媒系は80パーセントメタノール/20パーセント水（v/v）であり、これは実施例1において用いた溶媒系である。

【0035】好ましくは、精製プロトコルでは4つ以上の帯域を用いる。当業者は、所定の溶媒系を用いるTLCプレート上での保持因子の範囲、又は所定のカラム充填及び溶媒系を用いる分析HPLCカラムでの保持時間の所定の範囲を考慮して帯域の適切な組を容易にかつ主観的に決定し、これらの帯域を特定の帯域に入る全ての化合物を精製するのに有効な分離用HPLC条件と相互に関連付けることができる。

【0036】ここに記載される方法を用いて、ライブラリに広範に適用される条件の組を迅速に同定することができる。これにより、ライブラリを分離用HPLC条件に晒す前にそのライブラリ全体に対して分析用HPLC

を実施することを含む伝統的な方法と比較したとき、ライブラリを精製するための非常に迅速なターンアラウンド・タイムが得られる。

【0037】化合物のライブラリを精製するのに適切な条件は、そのライブラリの代表試料を所定の分析用HPLCカラム、溶媒系及び流速、及び/又は所定のTLC裏層及び溶媒系について経路探索することによって実現することができる。相關する分離又は半分離HPLC法はそれらの精製パラメータを変更することなく化合物ライブラリの精製に適用することができ、そのため単一の方法をそのライブラリ全体に適用することができる。

【0038】好ましくは、TLC及びHPLCの両者を化合物の試料に対して行う。ライブラリ全体を精製する前に分離用又は半分離用HPLCをそのライブラリからの化合物の試料に対して行うことも好ましい。これによって、例えば、代表試料中の化合物の純度を決定することにより、それらの条件がそのライブラリ全体を精製するの適切であることを確認することができる。また、ライブラリの10ないし100%、好ましくは50ないし100%に対してTLCを行い、そのTLCを代表試料におけるものと比較することもできる。ライブラリ全体に対してTLCを行い、及び/又は化合物の代表試料の純度を決定することにより、そのライブラリの大部分が適度に精製され得ることを確実にものとすることができる。純度が代表試料に関して適切なものではない場合、又はそのライブラリのTLCが代表試料のものと十分に一致しない場合、代替りの分離用HPLC条件を用いることができる。

【0039】ここに記載される方法は、化合物のライブラリの精製及び特徴付けの時間を実質的に節約し、かつ純度が90%を上回る化合物を提供することが可能である。

【0040】一つの態様において、本発明は以下の工程の実施を含む：

- a) 精製しようとする化合物のライブラリを選択する工程、
- b) 該ライブラリの代表試料に対してTLC及び/又は分析用HPLCを行う工程であって、該試料は該ライブラリの10パーセント未満を構成する工程、
- c) 該代表試料が分析用HPLCカラムからどのように溶出するか（保持時間の帯域の同定）、及び/又は該試料がTLCプレート上をどのように移動するか（保持因子の帯域の同定）に応じて、相互に関連付けられた分離用HPLC法を決定する工程、及び
- d) 該ライブラリの全て又は実質的に全てを精製する工程、ここで、該相互に関連付けられた分離用HPLC法は、分析用HPLCが行われる場合には保持時間の3つ以上の帯域の間の相関、及び/又はTLCが行われる場合には保持因子の3つ以上の帯域の間の相関に基づいて、代表試料中の実質的に全ての化合物が特定の帯域に

入るのであれば特定の相互に関連付けられた分離用HPLCプロトコルを該帯域内に入る化合物の精製に用いることができるように決定される。

【0041】好ましくは、分析用HPLC及びTLCの両者を工程aにおいて行う。代表試料は、好ましくは、そのライブラリの全て又は実質的に全てを精製する前に分離用HPLCによって精製する。代表試料を精製した後、好ましくは、その試料中の化合物の純度を決定する。これにより、その方法をチェックしてそれが有効に働くことを確実なものにするための迅速かつ有効な手段が得られる。

【0042】純度を決定した後、任意に、工程aにおいて行ったTLCと同じであるか、又は実質的に同じ条件下で、そのライブラリの10ないし100パーセント、好ましくは50ないし100パーセントに対してTLCを行うことができる。これにより、代表試料に適合する精製条件がそのライブラリ全体にも適合することが確認される。

【0043】代表試料の純度をチェックし、ライブラリの大部分に対してTLCを行うことにより、その技術が化合物を適度に精製し、それらの条件がライブラリ全体に広範に適合することを確認することができる。所望の純度が得られない場合、及び／又は代表試料及びライブラリの10ないし100パーセントのTLCが、化合物が同じ帯域に移動することを示す場合、代替りの分離用HPLCプロトコルを決定する必要がある。幾つかの場合には、別々のプロトコルをそのライブラリの一部に適用することができる。

【0044】ライブラリの全て又は実質的に全ての分離用HPLCの間、分離用HPLCカラムから溶出する試料中の対象の化合物の存在をUV及び／又はMS検出を用いて決定することによって画分の収集を開始することが好ましい。

【0045】一つの態様においては、化合物のライブラリは、

a) 化合物又は化合物のライブラリからの代表試料のR_f又は保持時間をTLC又は分析用HPLCによって決定し、

b) 該R_f又は保持時間を、該TLC又は分析用HPLCに用いられる条件に相互に関連付けられている一組のパラメータを有する一組の分離用HPLC条件に相互に関連付け、及び

c) 該化合物又は該ライブラリ中の化合物に対して分離用又は半分分離用HPLCを行い、ここで、

i) 該分離用又は半分分離用HPLCカラムからの溶出液の一部はUV検出器に送り、該溶出液の他方の部分は質量分光計(MS)に送り；

ii) 対象の化合物が溶出していることをUV及び／又はMSが示すまで該溶出液を廃棄し、

iii) 対象の化合物を含む試料をMSによって特徴付

け、

iv) 対象の化合物を含む試料を集め、

v) いかなる不純物もカラムから除去されるようにカラムを適切な溶媒で洗浄し；

vi) カラムを再平衡化し、及び

vii) 精製及び／又は特徴付けようとする化合物の各々についてこれらの工程を必要に応じて反復する、ことによって精製される。

【0046】これらの方法により同じ時間枠でのUV吸光度及びMSデータの収集が可能となる。MSによる画分の収集にはそれに伴う幾つかの危険性があり、これには分子量の計算間違いによる所望の化合物の損失、付加物の形成、及び用いられる条件下でイオン化しない化合物の損失が含まれる。他方、MSによる画分の収集の利点は2、3の画分のみが集められるというものである。UV及びMSの両者によって画分の収集を開始することにより、MSによる画分の収集の利点を得られ、かつ不利益が回避される。しかしながら、そのように行うことに伴う困難は、UVによって画分を開始すること、及び高流速勾配を用いることが困難であることである。MS及び画分収集に向かう信頼のおける流れの分割を保証するため、メイクアップ・ポンプ(第2フロー・スプリッタの前でMS器機に流入する流れを希釈するオンライン希釈ポンプ)と探索子との間のラインにおける背圧はカラム後入力と画分収集との間のラインにおける背圧より小さいものでなければならない。望ましい圧力を達成するため、配管の必要条件を標準的なHPLC装置からより大きい直径に変更して増加した流速を扱い、かつ、任意に、画分の収集を開始するのにUV/DAD(ダイオードアレイ検出器)又は他の適切な検出器を用いることができる。

【0047】以下の工程は任意に行うことができる。化合物に関して集められた情報(すなわち、UV吸光度及びMS情報)は、リレーショナルデータベースに、好ましくはそれらの化合物に関する他の情報(すなわち、合成条件、生物検定情報、収率等)と共に記憶することができる。化合物は、さらに、例えば¹H NMRによって特徴付けることができる。より迅速に化合物を精製するため、HPLCに2つ以上のカラムを含め、そのうちの1つが化合物を精製する間に他のもの(1つもしくは複数)を洗浄及び再生することができる。この工程はクロマトグラフィーの平衡化中断時間を取り除く。

【0048】精製することができる化合物の型
事実上、HPLCカラムで溶出し得るあらゆる有機化合物をここに記載される方法に従って精製することができる。好ましくは、精製しようとする化合物は化合物のライブラリ、より好ましくは化合物のリード生成又はコンビナトリアルライブラリの一部である。この方法を用いて得ることができる純度は、典型的には90%を上回り、好ましくは95%を上回る。

【0049】「ライブラリ」という用語は、少なくとも3種類、好ましくは 10^2 ないし 10^9 種類、より好ましくは 10^2 ないし 10^4 種類の化合物を指す。好ましくは、これらの化合物は、それらの容易な合成を可能にする単一の溶液又は反応混合液の中の多数の化合物として調製される。化合物のライブラリ中の各々のメンバーは単離することができ、かつ、任意に、特徴付けることができる。

【0050】典型的には、これらの化合物は、ライブラリ、例えば、化合物のコンビナトリアルライブラリ又はリード最適化ライブラリを生成するため、少なくとも1つの位置、好ましくは2つ以上の位置において様々な異なる官能基で修飾可能である核構造を有する。

【0051】典型的な核構造は、少なくとも3つの炭素元素、及び通常は他の分子の付加による反応を受けてその構造を変化させることが可能な少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの部位を含む、直鎖、分岐鎖又は環状有機化合物である。

【0052】殺虫剤のファミリーの例には、1-アリアルピラゾール、ピロール、ピロリドン、及びニコチン酸誘導体が含まれる。しかしながら、適切な結合部位に結合することができるリガンド化合物は、例えば、ステロイド、ホルモン、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、酵素等であり得る。

【0053】適切な核構造には：ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、オリゴ糖、アルカロイド、キノリン、イソキノリン、ベンズイミダゾール、ベンゾチアゾール、プリン、ピリミジン、チアゾリジン、イミダゾピラジノン、オキサゾロピリジン、ピロール、ピロリジン、イミダゾリドン、ギノロン (guinolones)、アミノ酸、マクロライド、ペネム (penems)、糖、キサンチン、ベンゾチアジジン、アントラサイクリン、ジベンゾシクロヘプタジエン、イノシトール、ポルフィリン、コリン、及び幾何学的実質 (geometric solids) を提示する炭素骨格 (例えば、ドデカヘドラン) が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの核構造は天然化合物から誘導することができ、又は非天然修飾を含むことができる (すなわち、非天然アミノ酸及びヌクレオチド)。

【0054】核構造に適する修飾には以下のものが含まれる：

1) アミノ酸誘導体、これには、例えば、天然アルファ・アミノ酸の全て、誘導体を含む種、天然側鎖の変種又は模倣体を含む天然及び合成アミノ酸残基；N-置換グリシン残基；機能的にアミノ酸残基を模倣することが知られる天然及び合成種、例えば、スタチン、ベスタチン等。

【0055】2) ヌクレオチド誘導体、これには、天然及び合成ヌクレオチド、例えば、アデノシン、チミン、

グアニジン、ウリジン、シトシン、これらの誘導体並びにプリン環、糖環、リン酸結合の変種及び模倣体並びにこれらの幾つか又は全ての組み合わせが含まれる。様々な可能性のある構造修飾の全てを含むヌクレオチドプローブ (2ないし25ヌクレオチド) 及びオリゴヌクレオチド (25ヌクレオチド超)；天然ヌクレオチドのホモ及びヘテロ合成組み合わせ及び順列；合成プリン又はピリミジン種を含む誘導体及び変種、又はそれらの模倣体；様々な糖環模倣体；並びにホスホジエステル、ホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオホルムアセタール、メチレン (メチルイミノ)、3-N-カルバメート、モルホリノカルバメート及びペプチド核酸アナログを含むがこれらに限定されるものではない、広く様々な代替骨格アナログ。

【0056】3) 炭水化物誘導体、これには天然の生理学的活性炭水化物；関連化合物、例えば、グルコース、ガラクトース、シアル酸、ペクターD-グルコシルアミン及びノジョリマイシン (nojorimycin) (これらは両者ともグルコシダーゼの阻害剤である)；疑似糖、例えば、5a-カルバー2-D-ガラクトピラノース (これは、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) の成長を阻害することが知られる) ($n=1$)；合成炭水化物残基及びこれらの誘導体 ($n=1$) 並びに高マンノースオリゴ糖、既知抗生物質ストレプトマイシンを含む、自然界に見出されるこれらの複合オリゴマー性順列の全て ($n>1$) が含まれる。

【0057】4) 天然又は合成有機構造モチーフ。「モチーフ」という用語は、生物学的活性を有する特定の構造を有するか、又はそれを含む有機分子、例えば、酵素活性部位に相補的な構造を有する分子と定義される。この用語には、ファルマコフォアを含む医薬化合物のあらゆる公知基本構造又はそれらの代謝物が含まれる。これらの基本構造には、ペータラクタム、例えば、細菌細胞壁の生合成を阻害することが知られるペニシリン；CN S受容体に結合することが知られ、かつ抗うつ剤として用いられるジベンズアゼピン；細菌リボソームに結合することが知られるポリケチドマクロライド等が含まれる。これらの構造モチーフは、一般には、リガンド受容器に対する特異的で望ましい結合特性を有することが知られている。

【0058】5) 天然もしくは合成色素又は写真的増幅が可能である残基のようなレポーター要素であって、スルファミンイミド構造又は反応図式に合成によって組み込むことができる反応基を有し、かつその基のレポーター機能を妨害したり悪影響を及ぼすことなくその基を介して結合することができるレポーター要素。好ましい反応基は、アミノ、チオ、ヒドロキシ、カルボン酸、カルボン酸エステル、特にメチルエステル、酸塩化物、イソシアネート、アルキルハロゲン化物、アリールハロゲン

化物及びオキシラン基である。

【0059】6) 二重結合のような重合性基、又は縮重合もしくは共重合を受けることが可能な他の官能性を含む有機部分。適切な基には、ビニル基、オキシラン基、カルボン酸、酸塩化物、エステル、アミド、アズラクトン、ラクトン及びラクタムが含まれる。R及びR'について定義されるもののような他の有機部分を用いることもできる。

【0060】7) 巨大分子成分、例えば、上に概述される様々な反応基を介して、リガンド-受容体分子への結合種の結合が悪影響を及ぼさず、かつ結合する官能性の相互作用活性がその巨大分子によって決定又は制限されるような様式でスルファミンイミドモジュールに結合することができる巨大分子表面又は構造。巨大分子成分の例には、多孔性及び非多孔性無機成分、例えば、通常又は逆相クロマトグラフィー分離、水の精製、塗料用顔料のような様々な用途に通常用いられるシリカ、アルミナ、ジルコニア、チタニア等；タンパク質の精製、水の軟化に通常用いられる、スチレンジニルベンゼンビーズ、様々なメタクリレートビーズ、PVAビーズのような合成成分を含む多孔性及び非多孔性有機巨大分子成分；他の適用、天然成分、例えば天然、並びに機能化セルロース、例えば、アガロース及びキチン、ナイロン、ポリエーテルスルホンもしくは上記材料のいずれかで作製したシート及び中空繊維膜が含まれる。これらの巨大分子の分子量は約2000ダルトンまでの範囲であり得る。

【0061】適切な化学修飾には、適切な有機部分、放射性部分、水素原子、有機部分であって適切な求電子性基、例えば、アルデヒド、エステル、アルキルハロゲン化物、ケトン、ニトリル、エポキシド等；適切な求核性基、例えば、ヒドロキシ、アミノ、カルボキシレート、アミド、カルバニオン、尿素等を含む有機部分；又は下に定義される他の構造的多様性要素のうちの1つへの結合も含まれる。加えて、化学修飾は、単環、二環式もしくは三環式環系；又は前記式で定義される化合物の反復単位の末端に結合し；もしくは他の部分に別々に結合してもよい構造の形態であってもよい。

【0062】これらの修飾は同じであっても異なってもよく、各々が1つ以上の炭素、窒素、イオウ、酸素原子、あらゆる他の無機要素又はそれらの組み合わせであり得る。例えば、核構造をシアノ、ニトロ、ハロゲン、酸素、ヒドロキシ、アルコキシ、チオ、直鎖もしくは分岐鎖アルキル、炭素環式アリール及びそれらの置換もしくは複素環誘導体で修飾することができる。これらの修飾は隣接分子核が異なってもよく、それらが結合する炭素原子に関して選択された立体化学配置を有していてもよい。

【0063】化合物は、論理的な方式で、マルチチューブアレイ又はマルチウェルプレートにおいて、化合物の

配列の形態で配置することができる。好ましくは、これらの化合物は全て中心核構造を有し、かつ特定の用途に最適な化合物を決定するための構造-活性関係の同定を可能にする修飾を有する。

【0064】この配列は、合成、精製、及び評価の効率を高めてその試験から得られた情報内容を最大化し、かつそのデータの迅速な評価を容易にするような方式で順序付けることができる。

【0065】これらの配列は論理的に順序付けられ、かつ配置された、化合物の下位配列で構成することができる。共通の構造及びその構造の様々な修飾を有する構造的に関連する個々の化合物の、空間的にアドレス指定可能な組を含む下位配列を調製することができる。下位配列は、その構造の複数の位置が修飾され、かつ所定の下位配列内のいかなる2つの化合物の間の変動にも、例えば、特定の構造のゼロ(0)又は1つ(1)の変化が含まれ得るときに特に有用である。

【0066】これらの下位配列及び配列は、系統付けをして配列の組を含むより高次の配列を形成することができ、かつより高次の配列として評価して関心のある共通核構造についての最適構造の特徴に関する情報を得ることができる。

【0067】下位配列は、所望の用途に対するものに加えて、物理及び反応特性の変化に対する効果に対する既知断片が有する効果に関する情報を化合物の直接比較が自動的に生じるような方式で配置することができる。あらゆる数の独立に可変の構造的な多様性要素nに対する単純な集合論によってもたらされるように、n個の構造的な多様性要素の各々の変動の効果に関する関係情報が適切に配置された下位配列の相対アドレスからの試験データの比較によって同様の方式で得ることができるような、n個の論理的な高次配列配置が存在する。

【0068】核分子の可能性のある合成変動の全てをスクリーニングすることにより、最適候補の選択は化合物選択の「合理的な」基礎というよりもデータ収集方法の機能である。望ましい物理的及び化学的特性、すなわち、結合親和性及び生物活性を迅速に最適化することができ、特定の配列又は下位配列内で構造の変化に直接相互に関連付けることができる。

【0069】マルチチューブ・ラック内での各化合物の空間アドレスは既知であるため、これらの配列を試験して、肯定的な結果が：(1) 所定の空間アドレス内の化合物に関する情報；(2) 一組の系統的構造同属種に関するこの情報の同時に生じる近傍位置；(3) 肯定的な結果の存在下において否定的な結果から関係構造情報を取り出す能力をもたらしように完全な関係構造情報を生成することができる。

【0070】好ましくは、精製はコンピュータ制御で行い、マルチチューブアレイにおける各チューブ又はマルチウェルプレートにおける各ウェルの位置をコンピュー

タに保存し、合成しようとする化合物の素性を「メモリーマップ」又は化合物のデータをチューブ又はウェルの位置に相互に関連付けるための他の手段でコンピュータに保存する。その代わりに、精製を手動で、好ましくはマルチチューブ・ラック又はマルチウェルプレートで行い、その情報をコンピュータで保存することができる。それらのチューブ内の化合物を精製し、及び／又は特徴付けることができる。

【0071】以下の非限定的な例を参照することで本発明がさらに理解されるであろう。

【0072】実施例1：分析法

一連の化合物を、C18裏層を有するTLCプレートで、80/20 v/vメタノール/水溶媒系を用いて評価した。これらの化合物は、保持因子(Rf)の4つの範囲、Rf=0、0.05<Rf<0.2、0.2<Rf<0.8、又はRf>0.8のうちの1つを有するこ

とが見出された。

【0073】Rf=0ではない化合物を、内径が4.6 mmである5ミクロン、50mm C18逆相HPLCカラムから溶出した。これらの化合物は様々な勾配の2溶媒系、溶媒A(水/アセトニトリル98/1.5(v/v))及び溶媒B(100%メタノール)を用いて溶出した。

【0074】0.2ないし0.8のRfを有する化合物は以下に記載されるプロトコルI又はIIを用いて溶出した。0.05ないし0.2のRfを有する化合物は以下に記載されるプロトコルIII又はIIIを用いて溶出した。0.8を上回るRfを有する化合物は以下に記載されるプロトコルI又はIVを用いて溶出した。これらのプロトコルを表の形態で以下に示す。

【0075】

【表1】

プロトコルI(分析)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	1.5	75	25
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	75	25

【0076】

【表2】

プロトコルII(分析)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	1.5	45	55
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	45	55

【0077】

【表3】

プロトコルIII(分析)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	1.5	30	70
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	30	70

【0078】

【表4】

プロトコルIV(分析)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	1.5	95	5
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	95	5

【0079】分析用カラムに対するこれらの4つのプロトコルは、分離用HPLCカラム(内径50×20mm、5ミクロン以下の粒径を有するC18吸着剤を備え

る)に対する以下の4つのプロトコル(以下に表5-8に示す)にスケールアップすることができる。

【0080】

【表5】

プロトコールI (分離)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	28.0	90	10
5.0	28.0	75	25
6.0	30.0	5	95
7.0	25.0	0	100
9.0	25.0	90	10

【0081】

【表6】

プロトコールII (分離)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	15	70	30
1.0	28	45	55
6.0	28	0	100
7.0	28	0	100
9.0	30.0	70	30

【0082】

【表7】

プロトコールIII (分離)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	15.0	45	55
1.0	28.0	30	70
6.0	28.0	0	100
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	45	55

【0083】

【表8】

プロトコールIV (分離)

時間(分)	流速(mL/分)	%A	%B
0.0	15.0	98	2
1.0	28.0	95	5
6.0	28.0	5	95
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	98	2

【0084】この例においては、オート・インジェクタは819注入弁アクチュエータを備えるGilson 215液体ハンドラであった。画分コレクタはGilson 215液体ハンドラであった。勾配ポンプは50SCポンプヘッドを備える2つのGilsonポンプ306モデルであった。希釈ポンプは1.5SCポンプヘッドを備えるGilson 307ポンプであった。平衡化ポンプは50SCポンプヘッドを備えるプログラム可能なHPLC Gilsonポンプ305モデルであった。ミキサは806Monometricモデルを備えるGilson 811Cダイナミック・ミキサであった。圧力モニタはGilson 806モデル圧力モニタであった。用いられたHPLC検出器はmicromassからのMS検出器Platform LCモデルを備える

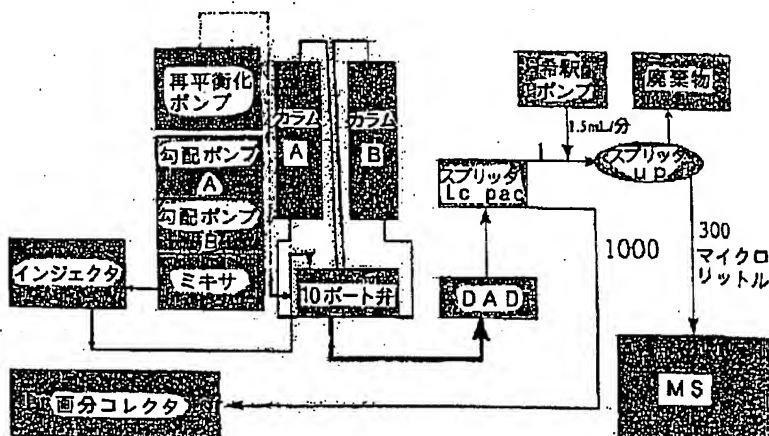
Gilson 170モデル・ダイオードアレイ検出器であった。このMS検出器は、大気化学的イオン化(APCI)及びMegaflo エレクトロスプレー・イオン化探索子の両者を用いることが可能な大気圧イオン化(API)源を備える4部構成質量アナライザを含む。この質量分光計はロータリーポンプ及びトランスフォーマを備える。開閉弁は2つのGilson弁メート及び10ポートRheodyne開閉弁であった。スプリッタはLC充填による1つの1/1000 ACURATE及びUpchurchスプリッタであった。データ収集システムはDigital CELEB GL-2コンピュータ、モニタ及びHewlett Packard Laser Jet 6Pプリンタであり、これはWindows NT V. 4. 0の下で作動するmi

cromass Masslynx NT 3.1B
6、OpenLynx Version™、Frac
tionLynx™及びGilson製Unipoi
nt v. 1.64ソフトウェアを含んでいた。

【0085】自動prep-HPLC/UV/MSを以
下に示すように組み立てた。

【0086】

【化1】



【0087】このシステムの配管のサイズは以下の通りである：ミキサからインジェクタまで、インジェクタからカラムまで、カラムからUVダイオードアレイ検出器まで、及びUVからスプリッタ・ボックスまではGreen Peek、Upchurch Scientific, INC 0.03" IDであった。メークアップ・ポンプからスプリッタ・ボックスまではGreen Peek、Upchurch Scientific, INC 0.01" IDであった。スプリッタ・ボックスからupchurchスプリッタまではGreen Peek、Upchurch Scientific, INC 0.007" IDであった。Upchurchスプリッタから廃棄物リザーバまではGreen Peek、Upchurch Scientific, INC 0.01" IDであった。スプリッタから画分コレクタまでは0.04" ID (Tubing Accurate/FC カタログ番号PE-1000FC) であった。

【0088】これらの配管サイズにより、30mL/分の流速及び比較的小さい吸着剤粒径（5ミクロン以下）を以下に記載される精製方法で用いることが可能となった。従来のHPLCにおいて典型的に見出されるより小さい配管サイズでは、この流速の速さを達成することは非常に困難であり、したがって、この精製方法を実施することが非常に困難である。

【0089】上図はHPLCモジュールが動作する間の試料分離の経路を示す。注入後、勾配ポンプからの溶媒がカラムA内の成分を分離し、その間カラムBは再平衡化ポンプによって再平衡化されている。10ポートRheodyne開閉弁がこの作動を制御する。分離された成分はUVダイオードアレイ検出器に入り、次にスプリッタ・ボックスに進む。スプリッタ・ボックスでは、流れが1/1000の比で分割される。1部のみがMSに進んで残りは廃棄物リザーバに進み、対象の化合物がUV又はMSによって検出された後、画分収集が開始されて試料が集められる。MSに進む流れは希釈ポンプによって、エレクトロスプレー（ESP）探索子に向かう1.5mL/分の流れで希釈される。次に、希釈された流れは第2スプリッタ（Upchurchスプリッタ）によって再度分割され、約300μLのみがESP探索子に入って残りは廃棄物に送られる。第2スプリッタは大気圧化学的イオン化（APCI）探索子には必要ない。勾配ポンプはUnipointソフトウェアを用いて制御した。

【0090】MSがピークであるものと思われ、かつそのピークが画分コレクタに到達するときの遅延時間に加え、UV検出器とMSとの間の遅延時間を、クマリンを標準として用い、メタノール/水（50/50）移動相を用いて測定した。それを以下に表9に示す。

【0091】

【表9】

探索子	勾配流速 (mL/分)	メークアップ流速 (mL/分)	時間遅延 (秒) MS-FC	時間遅延 (秒) UV-MS
ESP	22	1.5	20	3.5
	28	1.5	15	9
	30	1.5	15	9
APCI	22	0.5	12	23
	28	0.5	15	12
	30	0.5	15	12

【0092】質量分光計は、遅延時間測定に先立ち、質量校正のためにPEG200からPEG1000で校正した。質量分光計は異なる流速で2つの探索子を変えた。

【0093】様々な化合物を、ここに記載される方法を用いてHPLCカラムに通した。これらの化合物は100-650g/モルの範囲の分子量を有し、試料サイズは0.1ないし200mgの範囲であり、かつ注入容積は50ないし2000マイクロリットルの範囲であった。

【0094】以下の例はこの高スループット法の精製への使用を示す。

【0095】実施例2：化合物の小ライブラリの精製
独自に開発した化合物のライブラリを選択し、80/20メタノール/水を溶離液として用いてこれらの化合物のうちの5つのTLCを得た。そのTLCを以下に示す。

【0096】

【化2】



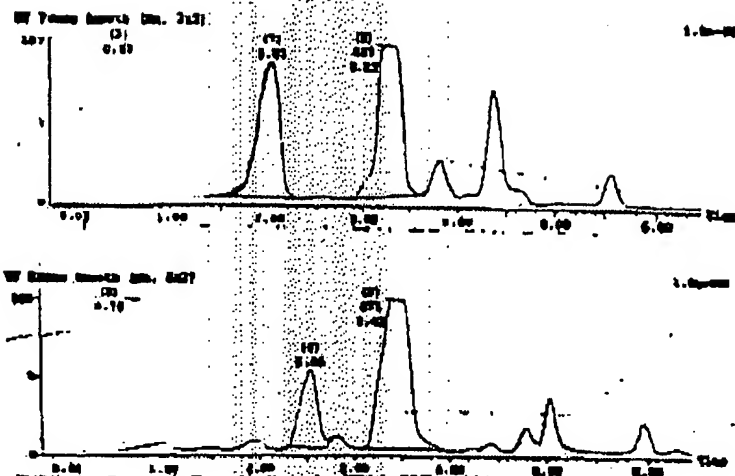
独自開発化合物のTLC

【0097】このTLCのRfは約0.11であるものと算出され、予め決定された分析用HPLC法（実施例1における方法II又はIII）に相互に関連付けられた。方法II及びIIIを別々に評価し、どちらが最良の分離をもたらすのかを決定した。クロマトグラム（以下に示す）は、方法IIが不純物からの化合物の精製により良好であることを示した。

【0098】対象の化合物を、2mLの注入容積及び150mg化合物/2mL DMFの濃度で、分離用HPLCカラムを用いて精製した。これらの化合物は、分離用HPLCカラムで、3分ないし3分半の保持時間を有していた。

【0099】

【化3】

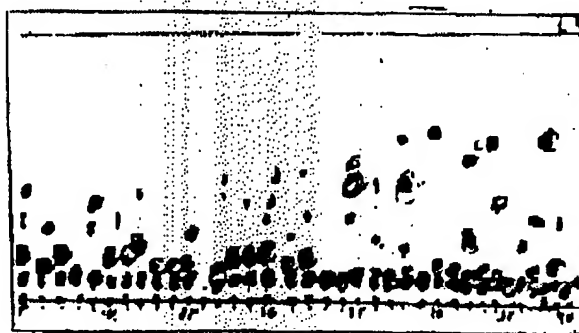


【0100】化合物の代表試料の精製に続き、ライブラリ全体に対してTLC（以下に示す）を行った。そのTLCは、対象の化合物全てがほぼ同じRf（約0.1）

で溶出することを示す。

【0101】

【化4】



【0102】分離用HPLC法をライブラリ中の450種類の化合物全てに適用し、平均収量28mgで91%の平均純度を得た。85%を上回る化合物が95%を上回る純度を有していた。

の態様に対する多くの等価物を認識し、又は定型的なものを超えることのない実験を用いて確認することができるであろう。そのような等価物は以下の請求の範囲に包含されることが意図されている。

【0103】当業者は、ここに記載される本発明の特定

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷
G 0 1 N 37/00
// C 0 7 B 61/00

識別記号
1 0 3

F I
G 0 1 N 37/00
C 0 7 B 61/00

テーマコード(参考)

1 0 3
C

1. Title of Invention

HPLC Method For Purifying Organic Compounds

2. Claims

1. A method for purifying and/or characterizing one or more organic compounds, comprising the steps of:

- a) selecting a library of compounds to be purified
- b) performing a TLC and/or an analytical HPLC on a representative sample of the library, which sample comprises less than ten percent of the library,
- c) determining a correlated preparative HPLC method depending on how the representative sample elutes off the analytical HPLC column and/or the sample moves on a TLC plate, and
- d) purifying all or substantially all of the library,

wherein the correlated preparative HPLC method is determined based on a correlation between three or more zones of retention times if analytical HPLC is performed and/or three or more zones of retention factors if TLC is performed, such that if substantially all of the compounds in the representative sample fall within a particular zone, a correlated preparative HPLC protocol can be used to purify compounds that fall within the zone.

2. The method according to claim 1, wherein both analytical HPLC and TLC are performed in step a.

3. The method according to claim 1, wherein the representative sample is purified via preparative HPLC before all or substantially all of the library is purified.

4. The method according to claim 3, wherein after the representative sample is purified, the purity of the compounds in the sample is determined.

5. The method according to claim 4, wherein after the purity is determined, a TLC is performed on between 10 and 100 percent of the library under the same or substantially the same conditions as the TLC performed in step a.

6. The method according to claim 5, wherein the TLC of the representative sample and the 10 to 100 percent of the library are compared.

7. The method according to claim 5, wherein between 50 and 100 percent of the library is analyzed via TLC.

8. The method according to claim 6, wherein if the TLC of the representative sample and the 10 to 100 percent of the library show that the compounds move into the same zone, then the entire library is purified via preparative HPLC.

9. The method according to claim 6, wherein if the TLC of the representative sample and the 10 to 100 percent of the library show that the compounds do not move into the same zone, then the entire library is purified via preparative HPLC using an alternative method.

10. The method according to claim 1, wherein the representative sample is between 2 and 5 percent of the entire library.

11. The method of claim 1, wherein during the preparative HPLC of all or substantially all of the library, fraction collection is triggered by determining the presence of the compound of interest in a sample which is eluting off of the preparative HPLC column using UV and/or MS detection.

12. The method of claim 1, wherein the purity of all or substantially all of the compounds purified via preparative HPLC is greater than 90 percent.

13. The method of claim 12, wherein analytical HPLC is performed, if at all, only on a representative sample prior to performing preparative HPLC.

3. Detailed Description of Invention

Field of the Invention

The present invention generally relates to the purification and/or characterization of libraries of compounds, for example, combinatorial and lead generation libraries.

Background of the Invention

Currently, there are many general methods for purifying synthetic compounds. These methods generally involve purifying a single target compound from multiple impurities.

Compounds are currently being prepared in relatively large numbers in combinatorial and lead generation libraries. Often, compounds are synthesized in multi-well plates or multi-tube arrays, with the number of related compounds numbering in the thousands. It is difficult to purify and characterize the libraries of compounds at the rate at which they are synthesized.

One method for purifying large numbers of compounds involves a repetitive method of chromatographing individual compounds. This constitutes a full cycle of synthesis, work-up, and purification for each molecule. Often, a large amount of time is spent developing an appropriate purification method for the compounds to be purified.

It would be advantageous to develop efficient methods for purifying and/or characterizing libraries of compounds which are applicable to a wide variety of organic compounds. The present invention provides such methods.

Summary of the Invention

Methods for purifying and/or characterizing compounds, particularly libraries of compounds such as combinatorial or lead generation libraries, are disclosed. Purification devices capable of being used in the method are also disclosed.

The method is premised on the discovery that structurally similar compounds, such as those in combinatorial and lead generation libraries, often have roughly similar retention factors (R_f s) on thin layer chromatography (TLC) plates and retention times on high performance liquid chromatography (HPLC) columns. The method uses this discovery to determine optimum conditions for purifying a library of similar compounds.

For a given column packing, solvent system, and flow rate, most compounds tend to elute to a certain degree from an analytical and/or preparative HPLC column. Similarly, most compounds move to a certain degree on TLC plates. While some compounds do not move at all ($R_f = 0$), others move with a low R_f (for example, $0.05 < R_f < 0.2$), a medium R_f (for example, $0.2 < R_f < 0.8$), or a high R_f (for example, $R_f > 0.8$). One can readily determine a series of three or more, preferably four or more, zones of R_f s, or, in the case of analytical HPLCs, a series of zones of retention times, in which the majority of compounds in the library will elute (in the case of an analytical HPLC) or move (in the case of a TLC), for example, low, medium and high R_f s on a TLC plate. These zones can be correlated to preparative or semi-preparative methods for performing preparative or semi-preparative HPLCs.

For a given analytical HPLC and/or TLC protocol, a set of preparative HPLC conditions can be identified wherein compounds in one zone can be separated from compounds in other zones. Accordingly, if all or substantially all of the compounds in a representative sample of a library of compounds is present in the same zone, the library can be purified using the same HPLC protocol, which can be readily correlated to a zone on the TLC and/or analytical HPLC.

The methods described herein involve evaluating a representative sample of compounds from a library of compounds, such as a combinatorial or lead generation library, by TLC and/or analytical HPLC, to determine which zone they move on the TLC plate and/or elute off the analytical HPLC column. Once the zone is identified, a correlated preparative or semi-preparative method is used to purify the library.

Appropriate conditions for purifying a library of compounds can be worked out by route scouting a representative sample of the library for a given analytical HPLC column, solvent system and flow rate, and/or a given TLC backing and solvent system. A correlated preparative or semi-preparative HPLC method can be applied to purify the library of compounds without having to change the purification parameters, so that a single method can be applied to the entire library.

A suitable sample size is typically on the order of between 2 and 5% of the library, depending on the diversity of the compounds in the library. This approach is referred to herein as "route scouting," since one is scouting for an appropriate purification route.

Preferably, both the TLC and the HPLC are performed on the representative sample of compounds. It is also preferred to perform preparative or semi-preparative HPLC on a sample of compounds from the library before purifying the entire library. This allows one to verify that the conditions are suitable for purifying the entire library, for example, by determining the purity of the compounds in the representative sample. Also, one can perform a TLC on between 10 and 100%, preferably between 50 and 100% of the library and compare the TLC to that in the representative sample. By performing a TLC on the entire library and/or determining the purity of a representative sample of compounds, one can ensure that the majority of the library can be adequately purified. If the purity is not adequate on the representative sample, or if the TLC of the library does not sufficiently match that of the representative sample, alternative preparative HPLC conditions can be used.

The representative sample should encompass, if possible, the most polar and least polar compounds synthesized in the library, to help ensure that the method is applicable for the entire library.

The method described herein results in substantial time savings in the purification and characterization of libraries of compounds, and can provide compounds with greater than 90% purity.

Detailed Description

Compounds are often synthesized in the form of combinatorial libraries, which are often in the form of multi-well plates or multi-tube arrays. A major bottleneck in the synthesis, purification and evaluation of the compounds is determining appropriate purification conditions for the compounds. The methods described herein detail how entire libraries of structurally related compounds can be purified.

The methods are premised on the discovery that structurally similar compounds, such as those in combinatorial and lead generation libraries, often have roughly similar retention times on thin layer chromatography (TLC) plates and on high performance liquid chromatography (HPLC) columns. For a given sorbent, solvent system, and flow rate, most compounds tend to move a certain degree on a plate. For example, some compounds do not move much at all (R_f near 0). Others move with a low R_f (for example, between 0.05 and 0.2), a medium R_f (for example, between 0.2 and 0.8), or a high R_f (greater than 0.8). The methods use this discovery to determine optimum conditions for purifying a library of similar compounds.

An advantage of the methods is that analytical HPLC is performed, if at all, only on a representative sample prior to performing preparative HPLC. Using the methods described herein, the purity of all or substantially all of the compounds purified via preparative HPLC can be greater than 90 percent.

Definitions

As used herein, the term "preparative HPLC" and like terms is meant an HPLC system which is capable of producing high (500 or more) microgram, milligram, or gram sized product fractions. The term "preparative" includes both preparative and semi-preparative columns, but is not intended to include analytical columns, which provide fractions in the nanogram to low microgram range.

As used herein, the term "mechanically actuable" when referring to a switching valve is meant a valve whose different positions are selected by

other than manual actuation; i.e., by computer selection. The actual mechanical actuation may be electric (i.e. a solenoid controlled valve), pneumatic (i.e. an air pressure controlled valve), hydraulic (a liquid pressure controlled valve), or any other equivalent means.

As used herein, an "HPLC compatible detector" is a detector suitable for use in an HPLC system which is capable of providing a detectable signal upon elution of a compound peak. For example, a detector capable of generating a signal when a compound elutes from the column is an HPLC compatible detector. Where component absorbance varies widely, it may be necessary to utilize more than one detector. A detector capable of detecting a desired component is not an "incompatible" detector due to its inability to detect a non-desired peak.

A "waste reservoir" is a destination suitable for collecting eluate that does not include the compound of interest, for example, the solvent used to regenerate the column between runs or the eluate driven off the column before and after the compound of interest has eluted. Suitable waste reservoirs include flasks, bottles, or jugs.

HPLC Devices

Displacement chromatography (an example of which is HPLC) is based on the principle that in a sample the balance between stationary phase (SP) and mobile phase (MP) is shifted the direction of SP. Single components of a sample displace each other like a train and the displacing agent with the greater affinity to SP pushes this train by fractions out of the column. Gas chromatography, liquid chromatography and HPLC chromatography are some of the most well known examples of displacement chromatography.

An HPLC device typically includes at least the following components: a column, packed with a suitable stationary phase, a mobile phase, a pump for forcing the mobile phase through the column under pressure, and a detector for detecting the presence of compounds eluting off of the column. The device can optionally include a means for providing for

gradient elution, although such is not necessary using the methods described herein.

Routine methods and apparatus for carrying out HPLC separations are well known in the art, and are described, for example, in the following references: *J. Chromatography*, 192:222-227 (1980), *J. Liquid Chromatography* 4:661-680 (1981), and *J. Chromatography*, 249:193-198 (1982).

Suitable stationary phases are those in which the compound of interest elutes. Preferred columns are reverse phase columns, which may be natural (silica gel with alkyl chains of different lengths) or a synthetic crosslinked polymer (consisting of styrene and divinylbenzene). The particle size of the stationary phase is within the range from a few μm to several 100 μm . The most preferred stationary phase is a C_{18} column.

Suitable detection devices include mass spectrometers and UV detectors. The methods described herein use both of these detectors to determine when sample should be detected.

The methods described herein often require the use of relatively high pressures (for example, up to approximately 2000 psi), depending on the pump head, column size, mobile phase and sorbent particle size. These pressures may be in excess of normal operating conditions for standard preparative HPLC. The methods also often require using flow rates of mobile phase (for example, in excess of 30 mL/min) in excess of those used in normal operating conditions for standard preparative HPLCs.

In some embodiments, methanol/water is used as the mobile phase. Methanol/water solvent systems are more viscous than otherwise equivalent systems employing acetonitrile/water (which are more commonly used, but which can be more costly). The increased viscosity tends to create a high back pressure, and can require the use of high pressure tubing as well as tubing with wider than normal internal diameters. Further, the use of column packings (sorbents) with relatively small particle sizes (for example, 5 microns or less) can cause back pressure, further mandating the use of wider tubings.

Purification Method

The method involves evaluating a representative sample of compounds from a library of structurally similar compounds by TLC and/or analytical HPLC to determine which zone they move on the TLC plate and/or elute off the analytical HPLC column. Once the zone is identified, a correlated preparative or semi-preparative method is used to purify the library.

One can determine a series of three or more zones of retention factors on a TLC plate and/or retention times on an analytical HPLC trace, and correlate a preparative HPLC protocol to each of the zones. The zones can be, for example, low, medium and high R_f s on a TLC plate, where low, medium and high are arbitrary terms which can be defined in any suitable manner such that they correspond to a correlated preparative or semi-preparative HPLC protocol which separates compounds in one zone from compounds in the other zones. For a given analytical HPLC and/or TLC protocol, a set of HPLC conditions can be identified wherein compounds in one zone can be separated from compounds in other zones.

Accordingly, if a TLC or analytical HPLC shows that all or substantially all (i.e., greater than 95%) of the compounds in a library of compounds are present in the same zone, they can all be purified using one correlated HPLC protocol.

As used herein, a representative sample is typically less than 10 percent of the library; more preferably, less than 5 percent of the library, and most preferably, between 2 and 5 percent of the library. The number of compounds in the sample depends on the diversity of the library (in terms of polarity, and, hence, the retention time on an HPLC column or retention factor on a TLC plate). The representative compounds should encompass, if possible, the most polar and least polar compounds synthesized in the library, to help ensure that the method is applicable for all compounds in the library.

As used herein, a zone refers to a range of retention times or retention factors. For example, some compounds do not move much at all (R_f near 0).

Others move with a low Rf (for example, between 0.05 and 0.2), a medium Rf (for example, between 0.2 and 0.8), or a high Rf (greater than 0.8). Using a TLC and using these ranges of retention factors, three zones can be identified, low, medium and high. The zones can be correlated to preparative or semi-preparative HPLC conditions which purify compounds which move on the TLC plate with an Rf in the particular zone. A series of compounds was subjected to TLC and preparative HPLC using these representative zones, and the results are described in Example 1. A preferred solvent system for eluting compounds on a TLC plate is eighty percent methanol/20 percent water (v/v), and this is the solvent system which was used in Example 1.

Preferably, the purification protocol uses four or more zones. One of skill in the art can readily and subjectively determine an appropriate set of zones, taking into consideration a range of retention factors on a TLC plate, using a given solvent system, or a given range of retention times on an analytical HPLC column using a given column packing and solvent system, and correlate these zones to effective preparative HPLC conditions to purify all compounds which fall into a particular zone.

Using the methods described herein, one can quickly identify a set of conditions which applies broadly to the library. This results in a significantly quicker turnaround time for purifying the library when compared with traditional methods which involve performing an analytical HPLC on the entire library before subjecting the library to preparative HPLC conditions.

Appropriate conditions for purifying a library of compounds can be worked out by route scouting a representative sample of the library for a given analytical HPLC column, solvent system and flow rate, and/or a given TLC packing and solvent system. A correlated preparative or semi-preparative HPLC method can be applied to purify the library of compounds without having to change the purification parameters, so that a single method can be applied to the entire library.

Preferably, both the TLC and the HPLC are performed on the sample of compounds. It is also preferred to perform preparative or semi-preparative

HPLC on a sample of compounds from the library before purifying the entire library. This allows one to verify that the conditions are suitable for purifying the entire library, for example, by determining the purity of the compounds in the representative sample. Also, one can perform a TLC on between 10 and 100%, preferably between 50 and 100% of the library and compare the TLC to that in the representative sample. By performing a TLC on the entire library and/or determining the purity of a representative sample of compounds, one can ensure that the majority of the library can be adequately purified. If the purity is not adequate on the representative sample, or if the TLC of the library does not sufficiently match that of the representative sample, alternative preparative HPLC conditions can be used.

The method described herein results in substantial time savings in the purification and characterization of libraries of compounds, and can provide compounds with greater than 90% purity.

In one embodiment, the method involves performing the following steps:

- a) selecting a library of compounds to be purified
- b) performing a TLC and/or an analytical HPLC on a representative sample of the library, which sample comprises less than ten percent of the library,
- c) determining a correlated preparative HPLC method depending on how the representative sample elutes off the analytical HPLC column (identifying a zone of retention times) and/or the sample moves on a TLC plate (identifying a zone of retention factors), and
- d) purifying all or substantially all of the library,

wherein the correlated preparative HPLC method is determined based on a correlation between three or more zones of retention times if analytical HPLC is performed and/or three or more zones of retention factors if TLC is performed, such that if substantially all of the compounds in the representative sample fall within a particular zone, a correlated preparative HPLC protocol can be used to purify compounds that fall within the zone.

Preferably, both analytical HPLC and TLC are performed in step a.

The representative sample is preferably purified via preparative HPLC before all or substantially all of the library is purified. After the representative sample is purified, the purity of the compounds in the sample is preferably determined. This provides a fast and effective means for checking the method to ensure that it works effectively.

After the purity is determined, one can optionally perform a TLC on between 10 and 100 percent of the library, preferably between 50 and 100 percent of the library, under the same or substantially the same conditions as the TLC performed in step a. This verifies that the purification conditions which apply to the representative sample apply also to the entire library.

By checking the purity of the representative sample and by performing a TLC on a larger portion of the library, one can verify that the technique adequately purified the compounds, and that the conditions apply broadly to the entire library. If the desired purity is not obtained, and/or if the TLC of the representative sample and the 10 to 100 percent of the library show that the compounds do move into the same zone, then alternative preparative HPLC protocols need to be determined. In some cases, a separate protocol may be applied to a portion of the library.

During the preparative HPLC of all or substantially all of the library, it is preferred that fraction collection is triggered by determining the presence of the compound of interest in a sample which is eluting off of the preparative HPLC column using UV and/or MS detection.

In one embodiment, libraries of compounds are purified by

a) determining the R_f or retention time of a compound or a representative sample of compounds from a library of compounds by TLC or analytical HPLC,

b) correlating the R_f or retention time to a set of preparative HPLC conditions with a set of parameters which correlates to the conditions used for the TLC or analytical HPLC, and

c) performing preparative or semi-preparative HPLC on the compound or the compounds in the library, wherein

i) a portion of the eluent from the preparative or semi-

preparative HPLC column is sent to a UV detector and another portion of the eluent is sent to a mass spectrometer (MS);

ii) the eluent is discarded until UV and/or MS indicates that the compound of interest is eluting,

iii) the sample containing the compound of interest is characterized by MS,

iv) the sample containing the compound of interest is collected;

v) the column is washed with an appropriate solvent such that any impurities are removed from the column;

vi) the column is re-equilibrated, and

vii) the steps are repeated as necessary for each compound to be purified and/or characterized.

The methods allow collection of UV absorbance and MS data in the same time frame. Fraction collection by MS has several risks associated with it, including loss of desired compound due to miscalculation of molecular masses, formation of adducts, and loss of compounds that do not ionize under the conditions that are used. On the other hand, the advantage of fraction collection by MS is that only a few fractions are collected. The benefits of fraction collection by MS are obtained and the detriments are avoided by triggering fraction collection by both UV and MS. However, the difficulties associated with doing so are that it is difficult to trigger fraction by UV and use a high flow gradient. To ensure reliable splits of flow to the MS and the fraction collection, the back pressure in the line between the make-up pump (an on-line dilution pump which dilutes the flow which enters the MS instrument before the second flow splitter) and the probe must be less than the back pressure in the line between the post column input and the fraction collection. In order to achieve the desired pressure, one can change the tubing requirements from standard HPLC devices to provide wider diameters to handle the increased flow rates, and optionally use a UV/DAD (diode array detector) or other suitable detector to trigger fraction collection.

The following steps can optionally be performed. Information gathered on the compounds (i.e., the UV absorbance and MS information) can be stored in a relational database, preferably with other information about the compounds (i.e., synthesis conditions, bioassay information, yield, etc.). The compounds can be further characterized, for example, by ^1H NMR. To more rapidly purify compounds, the HPLC can include two or more columns, one of which purifies compounds while the other(s) is/are being cleaned and regenerated. This step removes the chromatographic equilibration downtime.

Types of Compounds which can be Purified

Virtually any organic compound which is capable of being eluted on an HPLC column can be purified according to the methods described herein. Preferably, the compounds to be purified are part of a library of compounds, more preferably, a lead generation or combinatorial library of compounds. The purity capable of being obtained using the method is typically greater than 90%, and is preferably greater than 95%.

The term "library" refers to at least 3, preferably from 10^3 to 10^6 and more preferably from 10^3 to 10^4 compounds. Preferably, these compounds are prepared as a multiplicity of compounds in a single solution or reaction mixture which permits facile synthesis thereof. Each member of the library of compounds can be isolated and, optionally, characterized.

Typically, the compounds have a core structure which can be modified at at least one position, preferably two or more positions, with a variety of different functional groups, in order to generate a library, for example, a combinatorial or lead optimization library of compounds.

Typical core structures are linear, branched or cyclic organic compounds that include at least three carbon atoms and at least one, and preferably at least two sites capable of undergoing a reaction to change the structure, usually by the addition of other molecules to the reactive site.

Examples of families of insecticides include 1-aryl pyrazoles, pyrroles, pyrrolidones, and nicotinic acid derivatives. However, ligand

compounds which may bind to the appropriate binding site may be, for example, steroids, hormones, peptides, proteins, oligonucleotides, oligoribonucleotides, enzymes, and the like.

Suitable core structures include, but are not limited to: peptides, proteins, oligonucleotides, oligoribonucleotides, oligosaccharides, alkaloids, quinolines, isoquinolines, benzimidazoles, benzothiazoles, purines, pyrimidines, thiazolidines, imidazopyrazinones, oxazolopyridines, pyrroles, pyrrolidines, imidazolidones, guinolones, amino acids, macrolides, penems, saccharides, xanthins, benzothiadiazine, anthracyclines, dibenzocycloheptadienes, inositols, porphyrins, corrins, and carboskeletons presenting geometric solids (e.g., dodecahedrane). The core structures can be derived from naturally occurring compounds, or can include non-natural modifications (i.e., non-naturally occurring amino acids and nucleotides).

Suitable modifications for the core structures include:

1) amino acid derivatives, which include, for example, natural and synthetic amino acid residues including all of the naturally occurring alpha amino acids, species having derivatives, variants or mimetics of the naturally occurring side chains; N-substituted glycine residues; natural and synthetic species known to functionally mimic amino acid residues, such as statin, bestatin, etc.

2) nucleotide derivatives, which includes natural and synthetic nucleotides, such as adenosine, thymine, guanine, uridine, cytosine, derivatives of these and variants and mimetics of the purine ring, the sugar ring, the phosphate linkage and combinations of some or all of these. Nucleotide probes (between 2 and 25 nucleotides) and oligonucleotides (more than 25 nucleotides) including all of the various possible structural modifications; homo and hetero-synthetic combinations and permutations of the naturally occurring nucleotides; derivatives and variants containing synthetic purine or pyrimidine species, or mimics of these; various sugar ring mimetics; and a wide variety of alternate backbone analogs, including but not limited to phosphodiester, phosphorothionate, phosphorodithionate,

phosphoramidate, alkyl phosphotriester, sulfamate, 3'-thioformacetal, methylene(methylimino), 3-N-carbamate, morpholino carbamate and peptide nucleic acid analogs.

3) a carbohydrate derivative, which would include natural physiologically active carbohydrates; related compounds, such as glucose, galactose, sialic acids, beta-D-glucosylamine and nojirimycin, which are both inhibitors of glucosidase; pseudo sugars, such as 5a-carba-2-D-galactopyranose, which is known to inhibit the growth of *Klebsiella pneumonia* ($n = 1$); synthetic carbohydrate residues and derivatives of these ($n = 1$) and all of the complex oligomeric permutations of these as found in nature, including high mannose oligosaccharides, the known antibiotic streptomycin ($n > 1$).

4) a naturally occurring or synthetic organic structural motif. The term "motif" is defined as an organic molecule having or containing a specific structure that has biological activity, such as a molecule having a complementary structure to an enzyme active site, for example. This term includes any of the well known basic structures of pharmaceutical compounds including pharmacophores, or metabolites thereof. These basic structures include beta-lactams, such as penicillin, known to inhibit bacterial cell wall biosynthesis; dibenzazepines, known to bind to CNS receptors and used as antidepressants; polyketide macrolides, known to bind to bacterial ribosomes, etc. These structural motifs are generally known to have specific desirable binding properties to ligand acceptors.

5) a reporter element, such as a natural or synthetic dye or a residue capable of photographic amplification which possesses reactive groups that may be synthetically incorporated into the sulfaminimide structure or reaction scheme, and may be attached through the groups without adversely interfering or affecting with the reporting functionality of the group. Preferred reactive groups are amino, thio, hydroxy, carboxylic acid, carboxylic acid ester, particularly methyl ester, acid chloride, isocyanate, alkyl halides, aryl halides and oxirane groups.

6) an organic moiety containing a polymerizable group such as a

double bond, or other functionalities capable of undergoing condensation polymerization or copolymerization. Suitable groups include vinyl groups, oxirane groups, carboxylic acids, acid chlorides, esters, amides, azlactones, lactones and lactams. Other organic moiety such as those defined for R and R' may also be used.

7) a macromolecular component, such as a macromolecular surface or structures which may be attached to the sulfaminimide modules via the various reactive groups outlined above, in a manner where the binding of the attached species to a ligand-receptor molecule is not adversely affected and the interactive activity of the attached functionality is determined or limited by the macromolecule. Examples of macromolecular components include porous and non-porous inorganic components, such as, for example, silica, alumina, zirconia, titania and the like, as commonly used for various applications, such as normal and reverse phase chromatographic separations, water purification, pigments for paints, etc.; porous and non-porous organic macromolecular components, including synthetic components such as styrenedivinyl benzene beads, various methacrylate beads, PVA beads, and the like, commonly used for protein purification, water softening, and a variety of other applications, natural components such as native and functionalized celluloses, such as, for example, agarose and chitin, sheet and hollow fiber membranes made from nylon, polyether sulfone or any of the materials mentioned above. The molecular weight of these macromolecules may range up to about 2000 Daltons.

Suitable chemical modifications also include chemical bonds to a suitable organic moiety, a radioactive moiety, a hydrogen atom, an organic moiety which contains a suitable electrophilic group, such as an aldehyde, ester, alkyl halide, ketone, nitrile, epoxide or the like; a suitable nucleophilic group, such as a hydroxyl, amino, carboxylate, amide, carbanion, urea or the like; or one of the other structural diversity elements defined below. In addition, the chemical modifications can be in the form of a ring, bi-cyclic or tri-cyclic ring system; or structure which connects to the ends of the repeating unit of the compound defined by the preceding formula; or may be

separately connected to other moieties.

The modifications can be the same or different and each may be one or more atoms of carbon, nitrogen, sulfur, oxygen, any other inorganic elements or combinations thereof. For example, the core structure can be modified with cyano, nitro, halogen, oxygen, hydroxy, alkoxy, thio, straight or branched chain alkyl, carbocyclic aryl and substituted or heterocyclic derivatives thereof. The modifications can be in different in adjacent molecular cores and have a selected stereochemical arrangement about the carbon atom to which they are attached.

The compounds can be laid out in a logical fashion in multi-tube arrays or multi-well plates, in the form of arrays of chemical compounds. Preferably, the compounds all have a central core structure, and have various modifications which permit the identification of structure-activity relationships with which to determine optimum compounds for a particular use.

The array can be ordered in such a fashion as to expedite synthesis, purification, and evaluation, to maximize the informational content obtained from the testing and to facilitate the rapid evaluation of that data.

The arrays can be constructed from logically ordered and arranged sub-arrays of compounds. Sub-arrays can be prepared which include spatially addressable sets of structurally related individual chemical compounds, with a common structure and a variable modification of the structure. Sub-arrays are particularly useful when multiple positions on the structure are modified, and the variation between any two compounds within a given sub-array can include, for example, zero (0) or one (1) change in a structure.

These sub-arrays and arrays can be organized to form higher order arrays that include sets of arrays, and can be evaluated as a higher order array to provide information regarding the optimum structural features for the common core structure of interest.

The sub-arrays can be arranged in such a manner that the direct comparisons of compounds automatically yields information regarding the

effect known fragments have on a desired application, as well as on the effect on changes in physical and reactive properties. As provided by simple set theory for any number of independently variable structural diversity elements n , there exists n logical higher order array arrangements, such that relational information on the effect of variation of each of the n structural diversity elements can be obtained in a similar manner by comparison of testing data from the relative addresses in appropriately arranged sub-arrays.

By screening all possible synthetic variations of a core molecule, the selection of the optimal candidate is more a function of the data collection method than the "rational" basis for selecting the compound. The desired physical and chemical properties, i.e., binding affinity and bioactivity, can be rapidly optimized, and directly correlated with the structural changes within a particular array or sub-array.

Because the spatial address of each compound within a multi-tube rack is known, the arrays can be tested to generate complete relational structural information such that a positive result provides: (1) information on a compound within any given spatial address; (2) simultaneous juxtaposition of this information upon a set of systematically structural congeners; (3) the ability to extract relational structural information from negative results in the presence of positive results.

Preferably, the purification is carried out via computer control, where the location of each tube in a multi-tube array or each well in a multi-well plate is stored in a computer, and the identity of the compound to be synthesized is stored in the computer in a "memory map" or other means for correlating the data for the compound to the position of the tube or well. Alternatively, the purification can be performed manually, preferably in multi-tube racks or multi-well plates, and the information stored on a computer. The compounds in the tubes can be purified and/or characterized.

The present invention will be further understood with reference to the following non-limiting examples:

Example 1: Analytical Methods

A series of compounds were evaluated on a TLC plate with a C18 backing using an 80/20 v/v methanol/water solvent system. The compounds were found to have one of four ranges of retention factors (R_f s), $R_f = 0$, $0.05 < R_f < 0.2$, $0.2 < R_f < 0.8$, or $R_f > 0.8$.

Those compounds which did not have an $R_f = 0$ were eluted off of a 5 micron, 50 mm C18 reverse phase HPLC column with an internal diameter of 4.6 mm. The compounds were eluted using various gradients of two solvent systems, solvent A (water/acetonitrile 98/1.5 (v/v)) and solvent B (100% methanol).

Those compounds with an R_f between 0.2 and 0.8 were eluted using protocol I or II as described below. Those compounds with an R_f between 0.05 and 0.2 were eluted using protocol II or III as described below. Those compounds with an R_f greater than 0.8 were eluted using protocol I or IV as described below. The protocols are presented below in tabular form.

Table 1
Protocol I (analytical)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	1.5	75	25
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	75	25

Table 2
Protocol II (analytical)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	1.5	45	55
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	45	55

Table 3
Protocol III (analytical)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	1.5	30	70
5.0	1.5	0	100
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	30	70

Table 4
Protocol IV (analytical)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	1.5	95	5
5.0	1.5	5	95
6.0	1.5	0	100
8.0	1.8	95	5

These four protocols on an analytical column can be scaled up to the following four protocols (shown below in tables 5-8) on a preparative HPLC column (50 X 20 mm id with a C18 sorbent with a particle size of 5 microns or less).

Table 5
Protocol I (preparative)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	28.0	90	10
5.0	28.0	75	25
6.0	30.0	5	95
7.0	25.0	0	100
9.0	25.0	90	10

Table 6
Protocol II (preparative)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	15	70	30
1.0	28	45	55
6.0	28	0	100
7.0	28	0	100
9.0	30.0	70	30

Table 7
Protocol III (preparative)

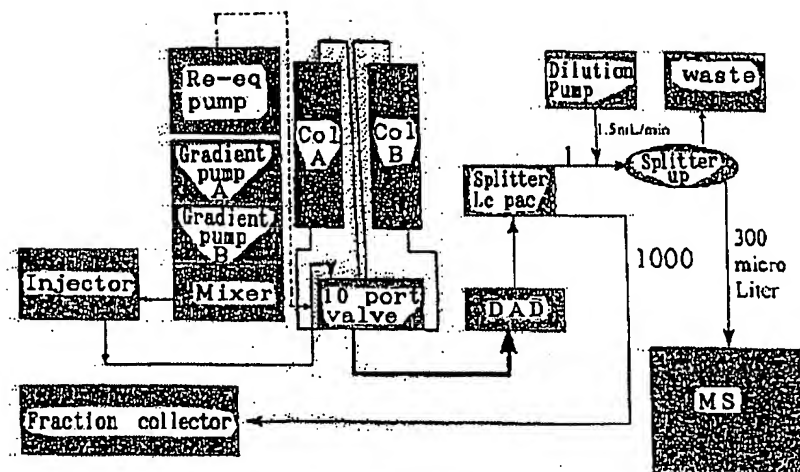
Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	15.0	45	55
1.0	28.0	30	70
6.0	28.0	0	100
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	45	55

Table 8
Protocol IV (preparative)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B
0.0	15.0	98	2
1.0	28.0	95	5
6.0	28.0	5	95
7.0	28.0	0	100
9.0	30.0	98	2

In this example, the auto-injector was a Gilson 215 liquid handler with an 819 injection valve actuator. The fraction collector was a Gilson 215 liquid handler. The gradient pumps were two Gilson pump 306 models with 50 SC pump heads. The dilution pumps were Gilson 307 pumps with 1.5 SC pump heads. The equilibration pump was a programmable HPLC Gilson pump 305 model with a 50 SC pump head. The mixer was a Gilson 811 C dynamic mixer with an 806 Monometric model. The pressure monitor was a Gilson 806 model pressure monitor. The HPLC detectors used were a Gilson 170 model diode array detector with a MS detector Platform LC model from micromass. The MS detector contains a quadrupole mass analyzer with atmospheric pressure ionization (API) source capable of using both atmospheric chemical ionization (APCI) and Megaflow electrospray ionization probes. The mass spectrometer is equipped with a rotary pump and a transformer. The switching valves were two Gilson valve mates and a 10 port Rheodyne switching valve. The splitter was one 1/1000 ACURATE by LC packing and an Upchurch splitter. The data collection system was a Digital CELEB GL-2 computer, monitor and Hewlett Packard Laser Jet 6P printer that included micromass Masslynx NT 3.1B6 work under Windows NT V. 4.0, OpenLynx Version™, FractionLynx™ and Gilson's Unipoint v. 1.64 software.

The automated prep-HPLC/UV/MS was assembled as shown below:



The tubing sizes for the system are as follows:

From the mixer to the injector, the injector to the column, the column to the UV diode array detector and from the UV to the splitter box was Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.03" ID. From the make-up pump to the splitter box was Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.01" ID. From the splitter box to the upchurch splitter was Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.007" ID. From the Upchurch splitter to the waste reservoir was Green Peek, Upchurch Scientific, INC 0.01" ID. From the splitter to the fraction collector was 0.04" ID (Tubing Accurate/FC cat. No. PE-1000 FC).

The tubing sizes permitted the use of a 30 mL/min flow rate and a relatively small sorbent particle size (5 microns or less) with the purification method described below. With the smaller tubing sizes typically found in conventional HPLCs, it would be extremely difficult to achieve this high of a flow rate, and, accordingly, it would be extremely difficult to perform the purification method.

The diagram above illustrates the path of sample isolation during an HPLC run. After injection, the solvents from the gradient pump separate the components in column A while column B is being re-equilibrated by the re-equilibration pump. A ten port Rheodyne switching valve controls this

action. The separated components enter into the UV diode array detector and then go to the splitter box. At the splitter box, the flow splits in a 1/1000 ratio. Only one part goes to the MS and the remainder goes to the waste reservoir after the compound of interest is detected by UV or MS, and the fraction collection is triggered and the sample collected. The flow that goes to the MS is diluted by a dilution pump with a flow of 1.5 mL/min for the electrospray (ESP) probe. Then, the diluted flow is split again by a second splitter (an Upchurch splitter) and only approximately 300 μ L enters the ESP probe and the remainder is sent to waste. A second splitter is not required for the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) probe. The gradient pumps were controlled using Unipoint software.

The delay time when the MS is seeing a peak and when the peak reaches the fraction collector, as well as the delay time between the UV detector and the MS were measured using coumarin as a standard, using a methanol/water (50/50) mobile phase, and are shown below in Table 9.

Table 9

Probe	Gradient flow rate (mL/min)	Make-up flow rate (mL/min)	Time delay (second) MS-FC	Time delay (second) UV-MS
ESP	22	1.5	20	3.5
	28	1.5	15	9
	30	1.5	15	9
APCI	22	0.5	12	23
	28	0.5	15	12
	30	0.5	15	12

The mass spectrometer was calibrated with PEG 200 to PEG 1000 for mass calibration prior to delay time measurement. The mass spectrometer was tuned with two probes at different flow rates.

A variety of compounds were passed through the HPLC column

using the methods described herein. The compounds had molecular weights ranging from 100-650 g/mol, with sample sizes ranging from 0.1 to 200 mg, and injection volumes ranging from 50 to 2000 microliters.

The following example illustrates the use of the high throughput method for purification.

Example 2: Purification of a Small Library of Compounds

A proprietary library of compounds was selected, and a TLC of 5 of the compounds was obtained, using 80/20 methanol/water as eluent. The TLC is shown below.

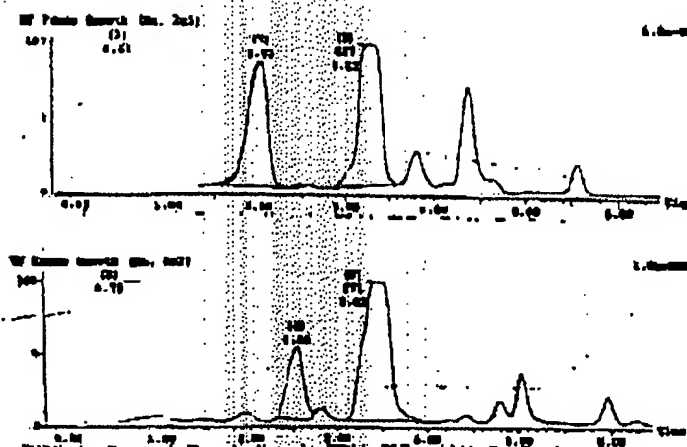


TLC of proprietary compounds

The TLC R_fs were calculated as being approximately 0.11 and correlated to pre-defined analytical HPLC methods (methods II or III in Example 1). Methods II and III were separately evaluated to determine which provided the best separations. The chromatograms (shown below) showed that method II was better at purifying the compound from the impurities.

The compounds of interest were purified on a preparative HPLC column, with an injection volume of 2 mL, and a concentration of 150 mg

compound/ 2 mL DMF. The compounds had retention times of between three and three and a half minutes on the preparative HPLC column.



Following the purification of the representative sample of compounds, a TLC (shown below) was done on the entire library. The TLC shows that all of the compounds of interest elute with approximately the same R_f (about 0.1).



The preparative HPLC method was applied to all 450 compounds in the library, and an average purity of 91% was obtained, with an average yield of 28 mg. More than 85% of the compounds had a purity greater than 95%.

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

1. Abstract

An HPLC method which purifies and/or characterizes large numbers of related compounds, for example, those prepared for use in combinatorial libraries, is disclosed. The compounds are purified on a semi-preparative or preparative scale, enabling rapid preparation of combinatorial libraries with minimal operator involvement, and, preferably, with a purity greater than about 90%.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.